Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set

es

Vysis LSI PML/RARA
Dual Color, Dual Fusion
Translocation

REF 01N36-020

B1N363

34-9378/R1

Abbott

Clave de los símbolos utilizados

REF	Número de referencia	LOT	Número de lote
IVD	Producto sanitario para uso en diagnóstico *in vitro*		Fecha de caducidad
-20°C	Almacénese a una temperatura inferior o igual a -20 °C		Consultar instrucciones de uso
EC REP	Representante autorizado		Atención: ver instrucciones de uso
	Fabricante legal		

Finalidad de uso

Esta sonda de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) se usa para detectar la translocación t(15;17)(q22;q12-21) que da lugar a una fusión de los genes PML/RARA.

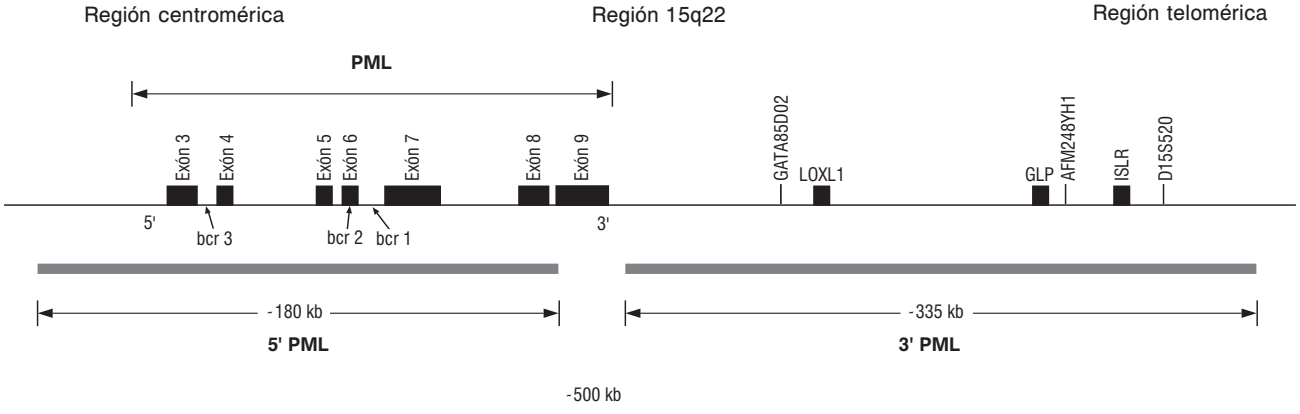
Resumen y explicación del ensayo

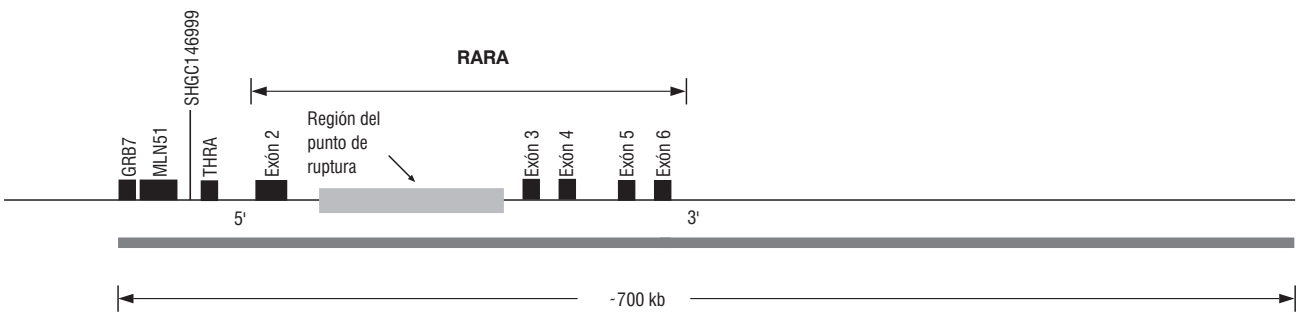
La mayoría de los casos de leucemia promielocítica aguda (APL) tiene una translocación t(15;17)(q22;q12-21) que fusiona el gen de la leucemia promielocítica (PML) en la banda 15q22 del cromosoma al gen alfa RARA del receptor del ácido retinoico (localizado en 17q12-q21).[1] La fusión de los genes PML/RARA se asocia a una buena respuesta a todos los tratamientos con ácido transretinoico.[1]

El identificador específico del locus (LSI) del conjunto de sondas PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation (de translocación, bicolor y doble fusión), se ha utilizado para varios estudios en la detección de las fusiones PML/RARA. Brockman y otros[2] utilizaron este conjunto de sondas para el estudio de 30 muestras de médulas óseas normales, 33 de muestras médulas óseas de pacientes con APL sin tratar, 14 pacientes en tratamiento para APL y 5 pacientes con APL con variantes de translocaciones conocidas. Otros estudios publicados por Yin y otros[3] y Moon y otros han utilizado también este conjunto de sondas.[4]

Descripción de la sonda

El conjunto de sondas LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation (de translocación, bicolor y doble fusión) es una mezcla de una sonda SpectrumGreen RARA y de una sonda SpectrumOrange PML. La sonda LSI RARA tiene una longitud aproximada de 700 kb y llega al gen RARA. La diana LSI PML tiene una longitud de aproximadamente 530 kb y llega al gen PML. Con la sonda diana PML quedan unos 15kb sin cubrir.





Reactivos

1. Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set (conjunto de sondas de translocación, bicolor, de doble fusión Vysis LSI PML/RARA) (número de referencia 30-191013)

(1 frasco de 20 µl). 650 ng/µl, sonda de DNA marcada con fluoróforo y DNA bloqueante en tampón Tris-EDTA.

2. Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer (tampón de hibridación Vysis LSI/WCP) (número de referencia 30-804826)

(1 tubo, 150 µl). Sulfato de dextrano, formamida, SSC (pH 7,0).

Existen fichas de datos de seguridad de todos los reactivos suministrados con estos equipos, disponibles en el Servicio de Asistencia Técnica de Abbott Molecular.

Almacenamiento

La sonda Vysis PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation se debe almacenar a una temperatura igual o inferior a -20 °C protegida de la luz.

Condiciones para el transporte

El conjunto de sondas LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation se transporta en envases con nieve carbónica.

Si recibe algún reactivo que no cumple con las recomendaciones de la etiqueta o está dañado, contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de Abbott Molecular.

Advertencias y precauciones

IVD Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.

El tampón de hibridación Vysis LSI/WCP ha sido clasificado según las directivas de la Comunidad Europea (CE) como: Tóxico (T) e Irritante (Xi). A continuación se indican las frases R (que indican los riesgos específicos derivados de los peligros de la sustancia) y frases S (consejos de prudencia en relación con el uso de la sustancia).

R41	Riesgo de lesiones oculares graves
R61	Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto
S45	En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta)
S53	Evítese la exposición - recábense instrucciones especiales antes del uso

Preparación de los reactivos

NOTA: Mida a temperatura ambiente el pH de las soluciones que así lo indiquen. Si no se indica lo contrario, utilice un pehachímetro con un electrodo de vidrio.

Solución de lavado 20X SSC

Mezcle bien 132 g de 20X SSC en 400 ml de agua purificada. Mida el pH y ajústelo a 5,3 con HCl. Añada agua purificada hasta conseguir un volumen total de 500 ml. Almacénese a temperatura ambiente. Deseche la solución una vez pasados seis meses, o si ésta presenta un aspecto turbio o contaminado.

Solución de lavado 2X SSC / 0,1% NP-40

Mezcle bien 100 ml de 20X SSC (pH 5,3) con 850 ml de agua purificada. Añada 1 ml de NP-40. Mezcle bien hasta que el NP-40 se haya disuelto completamente. Mida el pH y ajústelo a 7,0 ± 0,2 con NaOH. Añada agua purificada hasta alcanzar un volumen total de 1 litro. Almacénese a temperatura ambiente. Deseche la solución una vez pasados seis meses, o si ésta presenta un aspecto turbio o contaminado.

Solución desnaturalizante (formamida al 70% / 2X SSC)

Mezcle bien 49 ml de formamida, 7 ml de 20X SSC (pH 5,3) y 14 ml de agua purificada en una jarra de Coplin de vidrio. Verifique que el pH se encuentre entre 7,0 y 8,0 utilizando tiras reactivas de medición de pH. Cuando no la utilice, almacénela en un recipiente cerrado entre 2 °C y 8 °C. Deséchela después de transcurridos 7 días.

Soluciones de etanol (70%, 85%, 100%)

Prepare diluciones de etanol al 100% (v/v) con agua purificada. Cuando no las utilice, almacénelas a temperatura ambiente. Deséchelas transcurridos 6 meses.

Solución de lavado 0,4X SSC / 0,3% NP-40 para el procedimiento de lavado rápido

Mezcle bien 20 ml de 20X SSC (pH 5,3) con 950 ml de agua purificada. Añada 3 ml de NP-40. Mezcle bien hasta que el NP-40 se haya disuelto completamente. Mida el pH y ajústelo a 7,0 - 7,5 con NaOH. Añada agua purificada hasta alcanzar un volumen total de 1 litro. Almacénese a temperatura ambiente. Deseche la solución una vez pasados seis meses, o si ésta presenta un aspecto turbio o contaminado.

Almacenamiento de la sonda LSI DNA: La sonda LSI DNA se debe almacenar protegida de la luz a una temperatura inferior o igual a -20 °C.
Descomposición: Los fluoróforos son fotosensibles. Para limitar los efectos de esta descomposición, maneje las soluciones y los portaobjetos que contengan fluoróforos en condiciones de luz reducida. Lleve a cabo todos los pasos que no requieran luz (periodos de incubación, lavados, etc.) en la oscuridad.
Observaciones durante el procedimiento: Antes de su uso, descongele los reactivos a temperatura ambiente y a continuación, centrifugue cada tubo entre 2 y 3 segundos con una microcentrífuga de sobremesa.

Recogida y preparación de las muestras para el análisis

Las células de la médula ósea se deben cultivar, recoger, fijar y colocar en los portaobjetos para microscopio según los procedimientos habituales de citogenética.

Procedimiento

Materiales necesarios

- Conjunto de sondas Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation (de translocación, bicolor y fusión doble)
- Tampón de hibridación Vysis LSI/WCP

Materiales necesarios pero no suministrados

- HCl 12N (para el ajuste del pH de las soluciones de lavado)
- NaOH 1N (para el ajuste del pH de las soluciones de lavado)
- Jarras de Coplin de vidrio
- Termómetro calibrado

- Pinzas
- Probeta graduada de 1 000 ml
- Agitador magnético
- Etanol
- Microcentrífuga
- Puntas de pipeta (1 a 10 µl)
- Micropipetas (1 a 10 µl)
- Pehachímetro
- Portaobjetos de vidrio para microscopio limpios
- Agua purificada
- Cronómetro
- Mezclador Vórtex
- Baño de agua (37 ˚C y 72 ˚C)
- Microscopio de fluorescencia
- Incubador a 37 ˚C
- 20X SSC
- NP-40
- Formamida ultra-pura
- Tinción de contraste DAPI II
- Calentador para portaobjetos

Prepare tres jarras de Coplin: Añada 70 ml de etanol al 100% en una jarra; 70 ml de etanol al 85% en la segunda y 70 ml de etanol al 70% en la tercera. Utilícese a temperatura ambiente. Deséchelas transcurridos 7 días o si muestran dilución excesiva o evaporación.

Para asegurar buenos resultados, verifique que los reactivos se preparen y se usen a las temperaturas descritas en este prospecto.

Mida las temperaturas de las soluciones dentro de las jarras de Coplin con un termómetro calibrado.

Cuando realice una hibridación que combine las sondas de enumeración cromosómica (CEP) y LSI, proceda de acuerdo con el método general LSI para determinar el protocolo de calidad del reactivo.

Preparación de la muestra

NOTA: Deje que las jarras de Coplin que contienen la solución desnaturalizante alcancen la temperatura ambiente. Antes de su uso, coloque las jarras en un baño de agua a 73 ˚C ± 1 ˚C durante aproximadamente 30 minutos para que alcancen la temperatura adecuada.

1. Asegúrese de que la temperatura de la solución desnaturalizante sea de 73 ˚C ± 1 ˚C.
2. Sumerja los portaobjetos en la solución desnaturalizante durante 5 minutos.

   NOTA: No introduzca simultáneamente más de cuatro portaobjetos por cada jarra de Coplin.
3. Deshidrate los portaobjetos manteniéndolos 1 minuto en etanol al 70%, a continuación 1 minuto en etanol al 85% y por último 1 minuto en etanol al 100%.

   NOTA: Mantenga los portaobjetos sumergidos en la solución de etanol al 100% hasta que pueda secar todos los portaobjetos y aplicar la mezcla de sondas.

Preparación de la mezcla de sondas

1. Por cada área diana añada en un tubo de microcentrífuga los siguientes componentes a temperatura ambiente:

   7 µl de tampón de hibridación LSI/WCP

   1 µl de sonda

   2 µl de agua purificada

   NOTA: Si desea hibridar un máximo de tres sondas simultáneamente, cada una marcada de un fluoróforo diferente, añada un microlitro de cada sonda. Añada agua purificada hasta conseguir que la mezcla tenga un volumen de tres microlitros.
2. Centrifugue el tubo entre 1 y 3 segundos.
3. Agítelo con el Vórtex y centrifúguelo de nuevo.
4. Coloque los tubos en un baño de agua a 73 ˚C ± 1 ˚C durante 5 minutos.
5. Extraiga el tubo del baño de agua.
6. Colóquelo en un calentador de portaobjetos a una temperatura entre 45 ˚C y 50 ˚C hasta que aplique la sonda al DNA diana.

   NOTA: Si los portaobjetos están listos cuando haya desnaturalizado la sonda, puede aplicarla inmediatamente al DNA diana.

Hibridación de la sonda al área diana

NOTA: Prepare una cámara húmeda colocando en la pared lateral de un recipiente hermético una toallita de papel humedecida con agua. Colóquela en un incubador a 37 ˚C.

1. Saque los portaobjetos de la solución de etanol al 100%.
2. Seque el portaobjetos colocando el borde inferior en contacto con papel secante y seque la parte inferior con una toallita de papel.
3. Coloque los portaobjetos en un calentador para portaobjetos a 45 ˚C - 50 ˚C para evaporar el etanol restante.
4. Deposite 10 µl de la mezcla de sondas sobre un área diana y tápela inmediatamente con el cubreobjetos. Repita este proceso para las áreas adicionales.
5. Selle el cubreobjetos con adhesivo de caucho.
6. Coloque el portaobjetos en una cámara húmeda precalentada e incúbelo a 37 ˚C entre 6 y 16 horas.

Para conseguir que la intensidad de la señal del ensayo sea suficiente, la duración de la hibridación para la mayoría de las sondas LSI debe ser al menos de entre 12 y 16 horas.

Lavado del portaobjetos: Procedimiento de lavado rápido

NOTA: Cuando se trate de cortes de muestras incluidos en parafina, sustituya la solución de lavado 0,4X SSC/0,3% NP-40 por la 2X SSC/0,3% NP-40.

Preparación de las soluciones de lavado:

- Dispense 70 ml de 0,4X SSC/0,3% NP-40 en una jarra de Coplin y colóquela en un baño de agua a 73 ˚C ± 1 ˚C durante como mínimo 30 minutos antes de su uso. Puede utilizar esta solución durante un día, transcurrido este tiempo, deséchela.
- Dispense 70 ml de 2X SSC/0,1% NP-40 en una jarra de Coplin. Utilícese a temperatura ambiente. Puede utilizar esta solución durante un día, transcurrido este tiempo, deséchela.

NOTA: Para mantener la temperatura adecuada en la solución de lavado 0,4X SSC/0,3% NP-40, lave cuatro portaobjetos simultáneamente. Si tiene menos de cuatro, añada portaobjetos vacíos que estén a temperatura ambiente hasta tener un total de 4.

Cronometre después de haber sumergido el cuarto portaobjetos.

1. Retire el cubreobjetos de uno de los portaobjetos y sumerja éste último inmediatamente en 0,4X SSC/0,3% NP-40. Agite los portaobjetos de 1 a 3 segundos. Repita el mismo procedimiento con los demás portaobjetos.
2. Sáquelos transcurridos 2 minutos.

NOTA: Asegúrese de que la temperatura de las soluciones de lavado sea 73 ˚C ± 1 ˚C antes del lavado de otra serie de 4 portaobjetos.

3. Sumerja los portaobjetos en 2X SSC/0,1% NP-40. Agite los portaobjetos de 1 a 3 segundos. Saque los portaobjetos transcurridos de 5 segundos a 1 minuto.

Visualización de la hibridación

1. Deje que los portaobjetos se sequen al aire en la oscuridad.
2. Aplique 10 µl de la tinción de contraste DAPI II sobre el área de hibridación del portaobjetos y cubra con un cubreobjetos.

Visualice los portaobjetos utilizando un conjunto de filtros adecuados en un microscopio para fluorescencia que funcione correctamente. Los conjuntos de filtros ópticos que se describen a continuación le permitirán visualizar los fluoróforos utilizados en la hibridación.

Si utiliza este filtro de Vysis…	**Se produce la excitación y emisión simultánea de…**
DAPI/Orange	Fluoróforos DAPI y SpectrumOrange
DAPI/Green	Fluoróforos DAPI y SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	Fluoróforos SpectrumAqua, SpectrumGreen y SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	Fluoróforos DAPI, SpectrumOrange y SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	Fluoróforos DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen y SpectrumOrange

Almacenamiento: Los portaobjetos que se hayan almacenado a -20 ˚C y protegidos de la luz se pueden analizar al menos durante tres semanas después de la hibridación.

Utilización del proceso de codesnaturalización

La codesnaturalización es un proceso que simplifica la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) al combinar en un sólo paso la desnaturalización de la mezcla de sondas y de la muestra. Generalmente, la codesnaturalización consiste en colocar los portaobjetos de las muestras, con las sondas y los cubreobjetos, sobre una placa caliente o en el estante de una estufa o de un incubador que esté a la temperatura de desnaturalización. Transcurridos entre 2 y 10 minutos, los portaobjetos se retiran de la superficie caliente y se colocan en un incubador a la temperatura de hibridación.

Las condiciones documentadas para la codesnaturalización especifican un amplio intervalo de temperaturas y duración, que hacen necesaria la optimización de las condiciones de las aplicaciones y de los tipos de muestras. Los parámetros aquí descritos son para su uso con el Vysis HYBrite™ Denaturization/Hybridization System (sistema de desnaturalización/hibridación). En función de la muestra, serán necesarios procesos adicionales de optimización. El aspecto de una hibridación que utiliza la codesnaturalización puede variar con respecto a una hibridación en la que la muestra diana se desnaturaliza y se deshidrata antes de aplicar la sonda.

Preparación de un portaobjetos para la codesnaturalización

1. Por cada área diana añada en un tubo de microcentrífuga los siguientes componentes a temperatura ambiente:
   7 µl de tampón de hibridación LSI/WCP
   1 µl de sonda
   2 µl de agua purificada

NOTA: Si desea hibridar un máximo de 3 sondas simultáneamente, cada una provista de un fluoróforo diferente, añada 1 µl de cada sonda. Añada agua purificada hasta conseguir que la mezcla tenga un volumen de 3 µl.

2. Centrifugue el tubo entre 1 y 3 segundos.
3. Agítelo con el Vórtex y centrifúguelo de nuevo.
4. Dispense 10 µl de la mezcla de sondas sobre el portaobjetos y tápelo inmediatamente con un cubreobjetos.
5. Selle el cubreobjetos con adhesivo de caucho.

Elección de los parámetros del sistema de desnaturalización/hibridación

Las instrucciones que se describen a continuación son específicas del HYBrite™ Denaturation/Hybridization System. Si desea más información sobre la utilización de este instrumento, consulte la Guía del usuario del sistema HYBrite.

También es posible la utilización del ThermoBrite™ Denaturation/ Hybridization System ya que sus características térmicas son comparables a las del sistema HYBrite. Cuando utilice el sistema ThermoBrite, el control más estricto (± 1 ˚C) hará necesario el ajuste de las condiciones de desnaturalización e hibridación. Si desea información más detallada, consulte el apartado "Consejos, diagnóstico y solución de problemas" de este prospecto.

1. Para las muestras de linfocitos y de médula ósea cultivadas, ajuste la temperatura de fusión (Melt Temp) a 73 ˚C y el tiempo de fusión (Melt Time) a un 1 minuto. Para las muestras incluidas en parafina, ajuste la temperatura de fusión a 73 ˚C y el tiempo de fusión (Melt Time) a 5 minutos.
2. Fije la temperatura de hibridación (Hyb Temp) a 37 ˚C y el tiempo de hibridación (Hyb Time) entre 4 horas y toda la noche.
3. Una vez finalizada la hibridación, lave los portaobjetos mediante el procedimiento de lavado rápido.
4. Deje que los portaobjetos se sequen al aire en la oscuridad.
5. Aplique 10 µl de tinción de contraste al área diana y tápela con un cubreobjetos.

Procedimientos de control de calidad

Los controles positivos y negativos se deben analizar con muestras de paciente.

Limitaciones del procedimiento

La interpretación de los resultados FISH se debe realizar utilizando controles y técnicas de análisis adecuadas[5], así como tener en cuenta otros datos clínicos y de diagnóstico.

Resultados esperados

El patrón esperado para un núcleo que hibrida con el conjunto de sondas LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion es dos señales naranjas y dos verdes. En un núcleo con una translocación simple y fusión t(15;17)-PML/RARA, el patrón esperado es una señal verde (alelo normal RARA), una naranja (alelo normal PML) y dos fusiones naranja/verde, der(15) y der(17). Con este conjunto de sondas, Brockman y otros[2] reportaron un patrón con dos señales naranjas y dos verdes y una fusión en una translocación de tres vías t(15;17;19) así como, dos señales naranjas y una verde, y dos verdes menos intensas en una muestra con t(11;17). También se pueden observar otros patrones en muestras anormales. La interpretación de los resultados FISH se debe realizar utilizando controles y técnicas de análisis adecuadas[5], así como tener en cuenta otros datos clínicos y de diagnóstico.

Resultados del diagnóstico y solución de problemas de un ensayo de codenaturalización

La morfología del cromosoma observada en una hibridación en la cual se utiliza la codesnaturalización puede ser diferente a una muestra que se desnaturaliza y se deshidrata antes de aplicar la sonda.

Problema	Solución posible
Hibridación cruzada	Repita el ensayo con una muestra nueva realizando una de las acciones siguientes: ● Aumente 2 ˚C la temperatura de la solución de lavado 0,4X SSC/0,3% NP-40. Vaya aumentando la temperatura hasta que la intensidad de la señal sea aceptable. ● Reduzca 2 ˚C la temperatura de fusión.
El aspecto de la sonda es turbio	Repita el ensayo con una muestra nueva realizando una de las acciones siguientes: ● Aumente el tiempo de hibridación. ● Aumente la temperatura de fusión. Vaya aumentando la temperatura hasta que la morfología sea aceptable. ● Lave el portaobjetos utilizando 0,4X SSC/0,3% NP-40 a una temperatura entre 70 ˚C y 73 ˚C.
Señal difusa (moteada)	Repita la hibridación realizando una de las acciones siguientes: ● Reduzca 2 ˚C la temperatura de fusión. ● Reduzca el tiempo de fusión. **NOTA:** Vaya reduciendo la temperatura o el tiempo de fusión hasta que la intensidad de la señal sea aceptable. ● Lave utilizando 0,4X SSC/0,3% NP-40 entre 73 ˚C y 76 ˚C.
La morfología de la metafase es de poca calidad	Repita el ensayo con una muestra nueva realizando una de las acciones siguientes: ● Reduzca 2 ˚C la temperatura de fusión. ● Reduzca el tiempo de fusión. ● **NOTA:** Vaya reduciendo la temperatura o el tiempo de fusión hasta que la intensidad de la señal sea aceptable. ● Pretrate los portaobjetos: 1. Prepare una solución de 2X SSC/ paraformaldehído al 1%. 2. Sumerja el portaobjetos en 2X SSC/ paraformaldehído al 1% durante 1 minuto. 3. Sumerja varias veces los portaobjetos en agua purificada. 4. Deshidrátelos aclarándolos en series de un minuto con una solución de etanol (al 70%, 85% y 100%). 5. Deje secar los portaobjetos al aire y continúe con la preparación del portaobjetos para la codesnaturalización.

Problema	Solución posible
	• Si persiste la morfología de poca calidad, modifique la utilización del instrumento HYBrite: 1. Prepare 280 µl de formamida al 70%/solución de desnaturalización 2X SSC (196 µl de formamida / 28 µl de 2X SSC / 56 µl de agua purificada). 2. Ejecute un programa a una temperatura de mantenimiento (*HYBrite Hold Temp*) de 73 ˚C. 3. Añada 10 µl de formamida al 70%/ solución de desnaturalización 2X SSC en cada área diana y tápela con el cubreobjetos. 4. Cuando el HYBrite alcance 73 ˚C, coloque los portaobjetos sobre la superficie de calentamiento. Cierre la cubierta. 5. Retire los portaobjetos transcurridos 3 minutos. 6. Retire los cubreobjetos. 7. Continúe con el paso de deshidratación descrito en el apartado "Preparación de la muestra" para el procedimiento del ensayo no sometido a codesnaturalización.

Consejos, diagnóstico y solución de problemas

Cuando vaya a visualizar los resultados de un ensayo FISH, asegúrese de que el microscopio esté adecuadamente alineado y funcionando correctamente.

En la siguiente tabla se enumeran aquellos resultados que se desvían de lo que se considera un resultado óptimo al utilizar las sondas LSI. Asimismo, se incluyen las posibles causas y las sugerencias para mejorar el rendimiento del ensayo.

Problema	Causa probable	Solución posible
Morfología del cromosoma distorsionada.	Los portaobjetos de la muestra se han secado demasiado rápido durante la preparación.	Aumente la temperatura del baño termostático (aumenta la humedad) cuando dispense las muestras a los portaobjetos. Reduzca la temperatura del calentador para portaobjetos durante la preparación de la muestra. Aumente el tiempo de secado a temperatura ambiente a una noche como mínimo y a continuación, deje los portaobjetos como mínimo 24 horas a temperatura ambiente. No caliente los portaobjetos a altas temperaturas.
	La muestra está sobre-desnaturalizada.	Asegúrese de que la solución de desnaturalización se preparó de acuerdo con lo descrito en el prospecto. Asegúrese de que la temperatura de la solución de desnaturalización sea de 73 ˚C ± 1 ˚C antes de sumergir el portaobjetos. Reduzca la temperatura de fusión a 72 ˚C. Reduzca el tiempo que el portaobjetos está sumergido en la solución de desnaturalización entre 1 y 3 minutos.
	Los portaobjetos de la muestra no están completamente secos antes de su inmersión en la solución de desnaturalización.	Caliente los portaobjetos con las muestras a una temperatura entre 45 ˚C y 50 ˚C antes de desnaturalizarlos o deshidrátelos aclarándolos en series de un minuto con una solución de etanol (al 70%, 85% y 100%).
	Los portaobjetos estaban recién preparados antes de la desnaturalización.	Deje los portaobjetos como mínimo durante 24 horas a temperatura ambiente.
Fondo del portaobjetos demasiado intenso.	Los portaobjetos de vidrio están sucios antes de la preparación de la muestra.	Sumérjalos en etanol y séquelos utilizando papel sin pelusas antes dispensarlos.
	Residuo celular en la preparación de la muestra.	Lave 3 veces el sedimento con fijador recién preparado y repita el procesamiento de dispensación de muestra sobre el portaobjetos.
	Las extensiones de metafase están envejecidas por calentamiento o contienen citoplasma.	Aumente el tiempo que el portaobjetos está sumergido en la solución de desnaturalización a 10 minutos.
	El portaobjetos no se ha lavado correctamente tras la hibridación.	Asegúrese de que las soluciones de lavado se prepararon de acuerdo con lo descrito en el prospecto. Asegúrese de que el pH y la temperatura de las soluciones de lavado sean correctos. Retire los cubreobjetos. Repita el procedimiento de lavado.
Fondo del portaobjetos demasiado intenso.	Las soluciones de lavado se han utilizado durante demasiado tiempo o se han almacenado incorrectamente.	Asegúrese de que las soluciones de lavado que contengan formamida se almacenen a 4 ˚C. Deséchelas transcurridos 7 días o después de un uso muy frecuente. Deseche todas las otras soluciones de lavado transcurrido 1 día. Asegúrese de que el pH de las soluciones de lavado de formamida sea 7,0 – 8,0.
	La hibridación se ha observado con filtros de paso de banda ancha.	Cambie a filtros con ancho de banda estrecha o multibanda para reducir la luz de fondo.
Señal débil o inexistente.	El portaobjetos de la muestra no se ha desnaturalizado adecuadamente.	Asegúrese de que la temperatura de fusión en la jarra de Coplin sea de 73 ˚C ± 1 ˚C antes de sumergir el portaobjetos. Aumente la temperatura de fusión a 74 ˚C. Aumente el tiempo que el portaobjetos está sumergido en la solución de desnaturalización entre 2 y 4 minutos.

Problema	Causa probable	Solución posible
	El portaobjetos de la muestra no se ha preparado correctamente para FISH.	Contacte con el Centro de Asistencia Técnica de Abbott si desea más información sobre la preparación de las muestras para FISH.
	Los portaobjetos de la muestra no se han dejado reposar adecuadamente después de dispensar la muestra.	Déjelos durante 24 horas a temperatura ambiente antes de realizar la técnica FISH.
	Los portaobjetos de la muestra no están completamente secos antes de su inmersión en la solución de desnaturalización.	Caliente los portaobjetos con las muestras a una temperatura entre 45 ˚C y 50 ˚C antes de desnaturalizarlos o deshidrátelos aclarándolos en series de un minuto con una solución de etanol (al 70%, 85% y 100%).
	La muestra tenía bandas GTG.	La utilización de muestras con bandeo tripsina-Giemsa para FISH puede requerir ajustes en los protocolos de hibridación o de bandeo. Si desea más información sobre el bandeo, póngase en contacto con el Centro de Asistencia Técnica de Abbott. O utilice un portaobjetos con muestras recién preparados.
	No se ha añadido la sonda.	Prepare una nueva mezcla de sondas. Deje que la sonda se descongele completamente. Mezcle con un agitador tipo Vórtex o pipetee los reactivos que quiera mezclar y centrifugue brevemente. Pipetee la sonda lentamente.
	La sonda, el tampón de hibridación o la mezcla de sondas no se mezclaron bien antes de su uso.	Mezcle con un agitador tipo Vórtex o pipetee los reactivos que quiera mezclar y centrifugue brevemente.
	Las sondas no se han diluido correctamente para la hibridación.	Utilice los volúmenes indicados en el procedimiento del ensayo para mantener el cociente de la mezcla de sondas (7 µl de tampón de hibridación: 1 µl de sonda: 2 µl de agua purificada). Asegúrese de que la pipeta esté calibrada. Deje que el tampón de hibridación se descongele completamente y alcance la temperatura ambiente antes de utilizarlo. A continuación, pipetéelo lentamente.
	La sonda no se ha desnaturalizado correctamente. **NOTA:** No afecta a las sondas que se suministran en tampón de hibridación y están desnaturalizadas.	Asegúrese de que la temperatura del baño termostático utilizado para desnaturalizar la mezcla de sondas sea 73 ˚C ± 1 ˚C. Desnaturalice la mezcla de sondas durante 5 minutos.
	La sonda desnaturalizada no se aplicó inmediatamente a la muestra.	Aplique la sonda inmediatamente después de haber retirado los portaobjetos de la solución de etanol al 100%. Asegúrese de que la solución de etanol se ha evaporado antes de aplicar la sonda. Saque el tubo que contiene la mezcla de sondas del baño termostático a 73 ˚C ± 1 ˚C y colóquelo inmediatamente en el calentador para portaobjetos a una temperatura entre 45 ˚C y 50 ˚C. Mantenga el tubo en el calentador para portaobjetos mientras pipetea la sonda en el portaobjetos. Procese sólamente tantos portaobjetos como pueda y asegúrese de mantener la temperatura y la duración descritas en el proceso del ensayo.
Señal débil o inexistente.	La mezcla de sondas se ha secado excesivamente en el portaobjetos de la muestra.	Tape el área diana con el cubreobjetos inmediatamente después de aplicar la mezcla de sondas. Cuando lave la hibridación, retire primero el cubreobjetos de un portaobjetos y sumerja el portaobjetos en la solución de lavado antes de retirar el cubreobjetos del siguiente portaobjetos.
	Durante la hibridación se han formado burbujas debajo del cubreobjetos.	Deposite el cubreobjetos tocando primero la superficie de la mezcla de sondas. Coloque cuidadosamente el portaobjetos con el cubreobjetos hacia abajo sobre papel secante y elimine cuidadosamente las burbujas aplicando una ligera presión.
	Condiciones de hibridación inadecuadas.	Asegúrese de que se cumplan el tiempo y la duración establecidos para la hibridación. Asegúrese de que la temperatura del incubador sea de 37 ˚C. Selle bien y completamente el cubreobjetos con adhesivo de caucho. Aumente el tiempo de hibridación.

Problema	Causa probable	Solución posible
	Las condiciones o las soluciones de lavado no son correctas.	Asegúrese de que las soluciones de lavado se hayan preparado de acuerdo con lo descrito en el prospecto. Asegúrese de que la temperatura de las soluciones de lavado correspondan a las descritas en el procedimiento de lavado. Asegúrese de que los termómetros y los pehachímetros se hayan calibrado correctamente. Retire los cubreobjetos antes de sumergir los portaobjetos en la solución de lavado.
	Las sondas o los portaobjetos de las muestras se han almacenado incorrectamente.	Almacene la sonda sin diluir a una temperatura igual o inferior a -20 ˚C y protegida de la luz. Almacene los portaobjetos sin hibridar con desecante a una temperatura inferior o igual a -20 ˚C para un período prolongado de tiempo o a temperatura ambiente para períodos cortos. Almacene los portaobjetos hibridados protegidos de la luz a una temperatura inferior o igual a -20 ˚C hasta un máximo de 3 semanas.
	Se ha utilizado una tinción de contraste equivocada. La tinción de contraste es excesivamente brillante.	Retire los cubreobjetos. Sumerja los portaobjetos durante 5 minutos en 2X SSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente y deshidrátelos aclarándolos en series de un minuto con una solución de etanol (al 70%, 85% y 100%). Déjelos secar al aire y vuelva a aplicar la tinción de contraste.
	La hibridación se ha observado con un conjunto de filtros inapropiado.	Los conjuntos de filtros multibanda proporcionan menos luz que los filtros de paso de banda simple y por tanto las señales luminosas pueden parecer más débiles. Utilice el filtro correcto para visualizar el fluoróforo de la sonda. Si desea más información, póngase en contacto con el Centro de Asistencia Técnica de Abbott
	La configuración o los objetivos del microscopio no son adecuados para visualizar los resultados FISH o los filtros del microscopio están dañados.	Póngase en contacto con el fabricante del microscopio.
Señal poco específica.	Las sondas no se han diluido correctamente. A menudo es posible que haya excesiva cantidad de sonda en el ensayo.	Asegúrese de que la mezcla de sondas se haya preparado de acuerdo con lo descrito en el prospecto.
	Condiciones de hibridación inadecuadas.	Asegúrese de que la temperatura del incubador sea de 37 ˚C. Asegúrese de que se haya añadido la cantidad correcta de tampón de hibridación a la mezcla de la sonda.
	Temperatura de lavado demasiado baja.	Mantenga la temperatura de lavado de las soluciones de lavado colocando un máximo de cuatro portaobjetos en una jarra de Coplin cada vez y comprobando que la temperatura sea correcta antes de lavar otra serie de portaobjetos.
	Las condiciones restrictivas (astringencia) de la solución de lavado son demasiado débiles.	Asegúrese de que las soluciones de lavado se prepararon de acuerdo con lo descrito en el prospecto. **NOTA**: Cuanto menor sea la concentración de sales (SSC) y mayor la concentración de formamida y NP-40, mayor será la condición restrictiva (astringencia) del lavado.
Tinción de contraste brillante o débil.	La tinción aparece débil: los portaobjetos con las muestras no se han deshidratado antes de aplicarles la tinción o hay gotas de aceite en la tinción.	Retire los cubreobjetos. Sumerja los portaobjetos durante 5 minutos en 2X SSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente y deshidrátelos aclarándolos en series de un minuto con una solución de etanol (al 70%, 85% y 100%). Déjelos secar al aire y vuelva a aplicar la tinción de contraste.
	Concentración incorrecta de tinción de contraste. **NOTA:** La concentración de la tinción de contraste DAPI I es 8 veces superior a la de la tinción de contraste DAPI II.	Si la tinción es excesivamente brillante, dilúyala con Antifade Solution (número de referencia: 06J29-010) antes de aplicarla.
	La tinción de contraste ha caducado o ha estado expuesta a la luz durante períodos prolongados de tiempo.	Almacene la tinción protegida de la luz a una temperatura inferior o igual a -20 ˚C durante el uso. Asegúrese de que la tinción de contraste no se utilice transcurrida la fecha de caducidad.

Bibliografía

1. Grimwade D, reviewer. Br J Haematol. 1999;106:591-613. Review of: *The Pathogenesis of Acute Promyelocytic leukaemia: Evaluation of the Role of Molecular Diagnosis and Monitoring in the Management of the Disease*.
2. Brockman BR, Paternoster SF, Ketterling RP, et al. New Highly Sensitive Fluorescence In Situ Hybridization Method to Detect PML/RARA Fusion in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2003;145:144-151.
3. Yin CC, Glassman AB, Lin P, et al. Morphologic, Cytogenetic, and Molecular Abnormalities in Therapy-Related Acute Promyelocytic Leukemia. *AM J Clin Pathol* 2005;123:840-848.
4. Moon HW, Chang YH, Kim TY, et al. Incidence of Submicrosopic Deletions Vary According to Disease Entities and Chromosomal Translocations in Hematologic Malignancies: Investigation by Fluorescence In Situ Hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007;175:166-168.
5. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med* 2006;8:16-23.

Asistencia técnica:

Si requiere asistencia técnica, póngase en contacto con el Centro de Asistencia Técnica de Abbott o consulte la página web de Abbott Molecular en: http:\\www.abbottmolecular.com.

Dirección del representante autorizado
ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
Teléfono: +49-6122-580

La patente europea 0 430 402 B1 asignada a la Universidad de California y con autorización exclusiva para Abbott Molecular Inc., protege la utilización de las sondas Vysis LSI Dual Color Rearrangement o de las sondas Dual Color, Break Apart. La patente europea EP 0 444 115 B1 asignada a la Universidad de Yale y con autorización exclusiva para Abbott Molecular Inc., protege la utilización de sondas LSI de Vysis.

CEP, LSI, WCP, y Vysis son marcas comerciales registradas de Abbott Molecular Inc. SpectrumGreen, SpectrumRed, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold y HYBrite son marcas comerciales de Abbott Molecular Inc.

ThermoBrite es una marca comercial de Iris Sample Processing, Inc.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP
ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

© 2007 Abbott Laboratories

www.abbottmolecular.com
Noviembre 2007